

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Heinz Tiedemann

Untersuchungen über
phenylalaninspezifische
Transfer-Ribonucleinsäure
aus Hühnerembryonen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stephanie Reuter
aus Berlin

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

**Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin**

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Heinz Tiedemann

**Untersuchungen über
phenylalaninspezifische
Transfer-Ribonucleinsäure
aus Hühnerembryonen**



Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Stephanie Reuter
aus Berlin**

Referent: Prof.Dr.rer.nat. Dr.med. Heinz Tiedemann

Korreferent: Prof.Dr.med. Diether Neubert



**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin**

Promoviert am: 9.6.1976

Die Arbeitsgruppe Assistenzprofessor Dr. H. Gottschling war der Rahmen für die Experimente zu unseren Dissertationen. Wir danken Hubert Gottschling, daß er uns lehrte zu malen, das Bild uns aber selber malen ließ. Auf diese Weise wurde ein Freiraum für Denken, Experimente und Kritik erhalten, der Naturwissenschaften möglich macht.

Stephanie Reuter

Burghardt Wittig

Abkürzungen:

$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$	phenylalaninspezifische tRNS aus der Muskulatur von Hühnerembryonen
$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}} (\text{AP})$	tRNS-Produkt nach Säurebehandlung der $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$
Y_{ChEm}^+	fluoreszierende, hydrophobe Base aus $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ nach Säurebehandlung
ATP	Adenosintriphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
TCA	Trichloressigsäure
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

Definition: 1 $E_{260\text{nm}}$ -Einheit ist die Menge tRNS, die, gelöst in 1 ml 10 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, eine Extinktion von 1 bei 260 nm und 1-cm Lichtweg ergibt.

Enzyme: L-Aminosäure:tRNS-Ligase(AMP) (EC 6.1.1.)
L-Phenylalanin:tRNS-Ligase(AMP)
(EC 6.1.1.20.)

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Experimenteller Teil	4
2.1. Material	4
2.2. Methoden	5
2.2.1. Reinigung der $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$	5
2.2.2. Aminoacylierung von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$	6
2.2.3 Säurebehandlung zur Gewinnung der $\text{Y}_{\text{ChEm}}^{+}$ -Base und der $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP)	7
2.2.4. Chromatographieverfahren	8
2.2.5. Polyacrylamidgel-Elektrophorese	9
2.2.6. Extinktions- und Fluoreszenzspektrophotometrie	10
2.2.7. Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten in der Analytischen Ultrazentrifuge	12
2.2.8. Schmelzkurven von tRNS und deren Auswertung	12
3. Ergebnisse	16
3.1. Identifizierung von zwei phenylalaninspezifischen tRNS -Species	16
3.2. Fluoreszenzspektren der $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$	19
3.3. Isolierung und Charakterisierung der $\text{Y}_{\text{ChEm}}^{+}$ -Base	21
3.4. Vergleichende Charakterisierung von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP)	27

	Seite
3.4.1. Chromatographisches Verhalten und biologische Aktivität	27
3.4.2. Sedimentationskoeffizienten	33
3.4.3. Polyacrylamidgel-Elektrophorese	34
3.4.4. Thermische Denaturierung	36
3.5. "Renaturierung" von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP)	43
3.6. Enzymkinetische Konstanten	47
4. Diskussion	48
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	58

1. Einleitung

Transfer-Ribonucleinsäuren bilden unter der Vielfalt der in der Zelle vorhandenen Nucleinsäuren eine eigene Klasse, die durch ihre hochspezialisierten Funktionen auf der Ebene der Aminoacylierung und Proteinbiosynthese charakterisiert wird. Die Erfüllung dieser Funktionen verlangt für die Struktur der tRNS-Moleküle grundsätzlich zwei Eigenschaften: eine große Ähnlichkeit, um von allen beteiligten funktionellen und strukturellen Systemen als Angehörige einer Klasse erkannt zu werden, gepaart mit ausgeprägter Individualität in der Feinstruktur, um der Forderung nach der Spezifität der Funktionen gerecht werden zu können. Die bisher bekannt gewordenen Basenprimärsequenzen von tRNS lassen sich alle in einer Kleeblattform darstellen. Obwohl kein Strukturmodell im eigentlichen Sinne, sondern ein zweidimensionales Arrangement des Moleküls nach dem Prinzip, ein Maximum an Wasserstoffbrückenbindungen zu ermöglichen, ist das "Kleeblatt"-Modell zumindest zur formal einheitlichen Beschreibung einer tRNS-Species geeignet. So werden bei Anwendung dieses Modells in allen bisher bekannten Primärsequenzen von tRNS-Species gleichartige Sequenzabschnitte besonders in den nicht durch Wasserstoffbrücken verbundenen Regionen, den sogenannten "loops", offenbar. Im Unterschied dazu demonstriert das Modell

eine ausgesprochene Spezifität in den Abschnitten, in denen komplementäre Basenpaarung vorliegt. Ein anderes Prinzip, das verfolgt wird, um die Forderung nach Ähnlichkeit und Spezifität zu erfüllen, ist darin zu erkennen, daß in diesem Modell einige Positionen nur von einem Basentyp besetzt werden, der dann wiederum durch Modifikationen individuelle Bedeutung erlangen kann. So ist in allen phenylalaninspezifischen tRNA-Species aus dem Cytoplasma eukaryoter Organismen die Position neben dem 3'-Ende des Anticodon-Triplets durch die hochmodifizierte, hydrophobe, fluoreszierende Purinbase Y^+ besetzt (1,2,3,4). Die Base Y^+ , die am stärksten modifizierte Base einer Nucleinsäure, weist zwar in allen bisher aus dem Cytoplasma eukaryoter Organismen isolierten tRNA^{Phe}-Species ein identisches Grundgerüst auf, zeigt aber in den aliphatischen, z.T. hydrophoben Seitenketten eine ausgeprägte Spezifität in den bisher untersuchten Organismen (1,2,3,4).

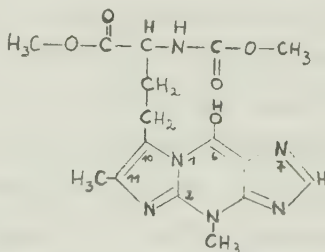


Abb.1. Strukturformel der Y^+ -Base aus Hefe.

Zitat THIEBE et.al. (5).

Die Base Y^+ mit ihren distinkten Eigenschaften prägt in vieler Hinsicht das physikochemische und funktionelle Verhalten von $tRNS^{Phe}$. So wird aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von Y^+ phenylalaninspezifische $tRNS$ bei Chromatographie an BD-Cellulose stärker gebunden als alle anderen $tRNS$ -Species; ein Faktum, das für die präparative Reinigung von $tRNS^{Phe}$ große Bedeutung hat, da mit einem einzigen Chromatographieschritt verhältnismäßig reine $tRNS^{Phe}$ gewonnen werden kann. Dies ist ein Grund dafür, daß die erste Röntgenstrukturanalyse eines $tRNS$ -Kristalls mit $tRNS^{Phe}$ aus Hefe durchgeführt wurde (6). Schon vorher aber konnten Informationen über die Struktur des Anticodon-loops durch fluoreszenzspektrophotometrische Untersuchungen gewonnen werden, da die relative Fluoreszenzintensität von der dreidimensionalen Konformation im Nachbarbereich der Y^+ -Base abhängig ist. Besonders für funktionelle Untersuchungen ist von Bedeutung, daß Y^+ durch milde Säurebehandlung aus dem $tRNS$ -Molekül abgespalten werden kann, ohne daß die Phosphodiester-Ribose-Kette zerbrochen wird. Im Fall von $tRNS^{Phe}$ aus Hefe ist nach Abspaltung der Y^+ -Base die Aminoacylierungskapazität unverändert, während die spezifischen Codon-Anticodon-Interaktionen nicht mehr möglich sind (7).

Da sich in vorläufigen Übersichtsversuchen, die sich mit der Multiplizität isoakzeptierender $tRNS$ -Arten befaßten, die

Existenz zweier phenylalaninspezifischer tRNS-Species schon abgezeichnet hatte (8), wurde zum Ziel der vorliegenden Arbeit gewählt, die Eigenschaften der phenylalaninspezifischen tRNS aus vorwiegend aus Muskulatur bestehendem Gewebe von Hühnerembryonen, $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$, insbesondere auch in Bezug auf ihre hochmodifizierte, fluoreszierende Base, Y_{ChEm}^+ , das tRNS-Produkt nach Abspaltung dieser Base, $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP), und die daraus resultierenden Funktionen bei der Aminoacylierungsreaktion zu untersuchen.

2. Experimenteller Teil

2.1. Material

^3H -markiertes Phenylalanin (6,15 Ci/mMol), ^{14}C -markiertes Phenylalanin (466 Ci/mMol) und OmniFluor wurden von NEN, Dreieichenhain, bezogen.

Kodak Professional Film (Nr.6127) wurde über die Firma Beckman Instruments GmbH, München, bezogen.

Benzoylierte DEAE-Cellulose der Firmen Serva, Heidelberg, und Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, wurde verwendet.

Cellulose-Dünnschichtchromatographieplatten waren von Merck, Darmstadt.

Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid und N,N,N',N'-Tetramethyläthyldiamin von Serva, Heidelberg, wurden für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet.

Alle anderen Chemikalien und Lösungsmittel wiesen den

Reinheitsgrad p.A. auf.

Plaskon CTFE und Adogen 464 für RPC-5 wurden freundlicherweise von Dr. J.F. Weiss (Chemical Technology Division, Oak Ridge National Laboratory) zur Verfügung gestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Reinigung der $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$

Die Isolierung von tRNS und die Präparation einer für L-Aminosäure:tRNS-Ligase(AMP) angereicherten Fraktion aus vorwiegend aus Muskulatur bestehendem Gewebe von 13 Tage alten Hühnerembryonen wurden bereits veröffentlicht (9). Dort wurde auch der erste Reinigungsschritt zur Abtrennung von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ durch BD-Cellulose-Chromatographie beschrieben. Diese $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ -Präparation mit einer spezifischen Phenylalanin-Akzeptorkapazität von $1100 \text{ pMol/E}_{260\text{nm}}^-$ Einheit wurde weiter durch Säulenchromatographie an einer "Reversed-Phase"-5-Matrix bei 32°C gereinigt. Dazu wurde in einer Säule ($0,6 \times 140 \text{ cm}$) RPC-5-Harz mit $0,6 \text{ M NaCl}$, 10 mM MgCl_2 , $1 \text{ mM 2-Mercaptoäthanol}$, 10 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7,0$, äquilibriert. Daran wurden dann $70 \text{ E}_{260\text{nm}}^-$ Einheiten $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ adsorbiert. Die tRNS wurde anschließend mit einem linearen Salzgradienten von $0,8 - 1,0 \text{ M NaCl}$ im gleichen Puffer (Gesamtvolumen 500 ml) eluiert. Alle Fraktionen mit einer größeren spezifischen Phenylalanin-Akzeptorkapazität als $1200 \text{ pMol/E}_{260\text{nm}}^-$ Einheit wurden

vereinigt und mit zwei Volumen auf -30°C gekühltem Äthanol gefällt. Der tRNS-Niederschlag wurde bei $20.000 \times g$ in einem Sorvall GSA Rotor 30 Minuten zentrifugiert und das Sediment in so viel bidestilliertem Wasser gelöst, daß sich eine tRNS-Konzentration von ungefähr $0,5 \text{ mg/ml}$ ergab. Die Lösungen wurden ausgiebig gegen Wasser dialysiert und dann bei -30°C aufbewahrt. Diese tRNS^{Phe}_{ChEm}-Präparationen hatten eine spezifische Phenylalanin-Akzeptorkapazität von mehr als $1500 \text{ pMol/E}_{260\text{nm}}$ -Einheit.

2.2.2. Aminoacylierung von tRNS^{Phe}_{ChEm}

Die Aminoacylierung von tRNS^{Phe}_{ChEm} wurde im analytischen Maßstab in $0,3 \text{ ml}$ Ansätzen mit folgenden Konzentrationen durchgeführt: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

5 mM MgCl_2

1 mM ATP

$8,3 \text{ }\mu\text{M}$ ^{14}C -markiertes Phenylalanin

(51 Ci/Mol) oder

$8,3 \text{ }\mu\text{M}$ ^3H -markiertes Phenylalanin

(503 Ci/Mol)

$0,1 - 1 \text{ }\mu\text{M}$ tRNS^{Phe}_{ChEm} oder tRNS^{Phe}_{ChEm} (AP)

Jeder Ansatz enthielt so viel von der L-Aminosäure:

tRNS-Ligase(AMP)-Präparation, um vollständige Beladung der tRNS mit Phenylalanin in $5 - 10$ Minuten zu gewährleisten. Enzym und tRNS wurden zusammen 3 Minuten bei

37 °C inkubiert und dann die Aminoacylierungsreaktion durch die Zugabe eines Reaktionsgemisches aus radioaktiv markiertem Phenylalanin, ATP und Mg^{++} in Tris-Puffer, pH 7,5 , gestartet und weiter bei 37 °C inkubiert. Bei allen Untersuchungen zur Renaturierung der $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (AP) wurde davon abweichend bei 20 °C inkubiert. Zur Bestimmung von radioaktiver Phenylalanyl- $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ wurden nach geeigneten Inkubationszeiten 50 μ l entnommen und auf Rundfiltern ($\varnothing$ 22 mm) verteilt. Die Plättchen wurden sofort in eiskalte 10 %ige TCA-Lösung (10 ml pro Plättchen) geworfen und, wie von BOLLUM (10) beschrieben, dreimal in 5 %igen TCA-Lösungen gewaschen, über Äthanol, Äthanol-Äther (1:1, v/v) in Äther überführt und getrocknet. Die durch Säure fällbare Radioaktivität wurde in 5 ml eines Szintillationscocktails (4 g Omnifluor, 100 g Naphthalin, Dioxan ad 1 l) in einem Nuclear Chicago Isocap/300-Flüssigkeitsszintillationssystem gezählt. Die Aminoacylierung von $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ im präparativen Maßstab wurde nach WITTIG et.al. (11) durchgeführt.

2.2.3. Säurebehandlung zur Gewinnung der γ_{ChEm}^{+} -Base und der $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (AP)

Die $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (in Wasser) oder 3H -markierte Phenylalanyl- $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (in 0,4 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Essigsäure, pH 5,0) wurde nach THIEBE et.al. (5) zweimal

mit jeweils zwei Volumen Chloroform extrahiert, um Verunreinigungen, welche die Chromatographie von Y_{ChEm}^+ stören könnten, vor der Abspaltung der Base zu entfernen. Danach wurde eine Ammoniumformiat-Konzentration von 0,1 M und ein pH von 2,9 durch Zugabe von 0,3 M Ammoniumformiat eingestellt. Nach 3 Stunden Inkubation bei pH 2,9 und 37 °C wurde mit 1 N NaOH pH 4,5 eingestellt und die Y_{ChEm}^+ -Verbindung zweimal mit jeweils zwei Volumen Chloroform extrahiert. Die beiden Chloroformextrakte wurden vereinigt und vorsichtig in einem Rotationsverdampfer auf ungefähr 0,5 ml eingeeengt. Die Verbindung wurde dann weiter durch Papier- oder Dünnschichtchromatographie gereinigt und analysiert. Die Säurebehandlung zur Gewinnung von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ wurde ohne Chloroformextraktionen durchgeführt.

2.2.4. Chromatographieverfahren

Säulen für die Chromatographie an benzoylesterter DEAE-Cellulose wurden nach der Beschreibung von GILLAM et.al. (12) gestopft. RPC-5-Harz wurde aus Plaskon CTFE und Adogen 464 entsprechend der Methode C nach PIERSON et.al. (13) hergestellt. "Reversed-Phase"-5-Chromatographie wurde als Hochdruckflüssigkeitschromatographie durchgeführt, um die benötigten Durchflußgeschwindigkeiten zu erreichen. Einzelheiten der Säulenchromatographieverfahren sind in den Legenden zu den Graphiken und bei WITTIG

(14) beschrieben. Zur Bestimmung der Radioaktivität in den Chromatographiefractionen aus Doppelmarkierungsexperimenten wurden aliquote Volumen von 0,1 - 1,0 ml in der Szintillationslösung nach BRAY (15) gezählt. Für die Berechnung der ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität in jeder Fraktion der Verteilung wurden die jeweiligen Zählausbeuten der beiden Radionuclide unter identischen quenching-Bedingungen in den beiden Kanälen des Nuclear Chicago Isocap/300-Flüssigkeits-szintillationssystem zugrunde gelegt.

Dünnschichtchromatogramme von Y_{ChEm}^+ wurden bei Raumtemperatur mit Methylacetat - 1-Propanol - Wasser (4:1:1, v/v/v, obere Phase) durchgeführt (7). Für die absteigende Papierchromatographie an Whatman no.1 - Papier wurde das gleiche Lösungsmittelsystem benutzt. Unter ultraviolettem Licht fluoreszierende Flecken und entsprechende Papierreferenzen wurden ausgeschnitten und mit einem für die jeweilige Substanz geeigneten Lösungsmittel in Kapillaren hinein eluiert. Mit dieser Methode gelingt es, die chromatographierte Substanz vollständig in ca. 50 μl Lösungsmittel aus dem Papier zu gewinnen.

2.2.5. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Es wurden 16 %ige Acrylamidgele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte im Diäthylbarbitursäure - Tris-HCl - Puffersystem nach RICHARDS et.al. (16). Ein Ansatz für

für 8 Gele war wie folgt zusammengesetzt:

10,4 ml einer 32 %igen Acrylamidlösung mit 2,6 % Bis-
acrylamid

10,4 ml Gelpuffer (0,18 M HCl, 0,486 M Tris, pH 8,9)

3,4 g Harnstoff

0,04 ml Temed

0,86 ml einer 1 %igen Ammoniumperoxodisulfatlösung

Die Gele wurden in Quarzröhrchen (10 x 0,6 cm) polymerisiert, die Polymerisationsdauer betrug ungefähr 30 Minuten. Jede Probe enthielt in 0,1 ml: 0,45 E_{260nm}-Einheiten tRNS, 0,042 g Harnstoff, 5 µl einer 0,01 %igen Bromphenolblaulösung. Die Elektrophorese wurde in einem Shandon-Elektrophoreseapparat durchgeführt. Als Elektrodenpuffer wurden verwendet: 30 mM Diäthylbarbitursäure, 3,3 mM Tris-HCl, pH 7,2. Es wurde mit einer Stromstärke von 0,5 mA pro Röhrchen begonnen und nach 15 Minuten langsam auf 5 mA pro Röhrchen erhöht. Unter diesen Bedingungen erreichte der Farbstoff nach ungefähr 1 Stunde das anodenseitige Ende des Trenngels. Unmittelbar nach der Elektrophorese wurde entlang den Gelen in den Quarzröhrchen mit einem Gilford Spectrophotometer 2400-S bei 280 nm die Extinktion gemessen. Bei kürzeren Wellenlängen war die unspezifische Extinktion der Harnstoff-Gele zu hoch.

2.2.6. Extinktions- und Fluoreszenzspektrophotometrie

Die Extinktionsspektren im ultravioletten Licht von papierchromatographisch gereinigter Y_{ChEm}^+ wurden in einem Gilford Spectrophotometer 2400-S gemessen. Die Referenzlösungen wurden durch Co-Elution von Chromatographiepapierabschnitten gewonnen, die in Größe und Wanderungstrecke den Probenflecken entsprachen. Zur Ermittlung der pK-Werte von Y_{ChEm}^+ wurden 13 Extinktionsspektren im ultravioletten Licht zwischen pH 1,0 und pH 13,0 aufgenommen und die Positionen der Extinktionsmaxima gegen den jeweiligen pH aufgetragen.

Fluoreszenzspektren wurden bei Raumtemperatur in einem Aminco-Bowman Spectrophotofluorometer gemessen. Das Gerät war mit einer 150 Watt-Xenonlampe Modell Nr. 281188 ausgerüstet. In Vorversuchen wurden die Wellenlängen für maximale Anregung und maximale Abstrahlung für die jeweilige Probe ermittelt. Weiter wurde nachgewiesen, daß die Wellenlänge des Emissionsmaximums unabhängig von der Anregungswellenlänge ist, um Lichtstreuungseffekte auszuschließen. Dann wurden die jeweiligen Emissionsspektren bei Anregung im korrespondierenden Exzitationsmaximum aufgenommen und entsprechend die Exzitationsspektren durch kontinuierliche Messungen des emittierten Lichts bei der Wellenlänge maximaler Emission ermittelt. Die Spektren wurden nicht für absolute Quantenausbeuten korrigiert, da relative Vergleiche für das

Ziel der Untersuchungen ausreichten. Die Hintergrundfluoreszenz der benutzten Lösungsmittel war in allen Fällen zu vernachlässigen, d.h. sie betrug in allen Fällen weniger als 1 % der relativen Fluoreszenz der Proben.

2.2.7 Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten in der Analytischen Ultrazentrifuge

Die Sedimentationskoeffizienten von $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ wurden durch Hochgeschwindigkeits-Sedimentationsanalyse in einer Analytischen Ultrazentrifuge Beckman Modell E bestimmt, die mit einem optischen System zur UV-Photographie ausgerüstet war. Die zu untersuchenden tRNA-Fraktionen wurden mit 0,5 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, bis zu einer $E_{260\text{nm}}$ von 0,3 - 0,5 verdünnt und ausgiebig gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die Experimente in der Analytischen Ultrazentrifuge wurden mit 50740 U/Min. bei 20 °C durchgeführt. Die unter diesen Bedingungen gemessenen Sedimentationskoeffizienten wurden für Wasser und 20 °C standardisiert. Einzelheiten zur analytischen Ultrazentrifugation, besonders die Auswertung der Daten, sind bei WITTIG (14) beschrieben.

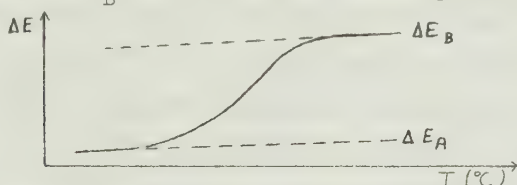
2.2.8. Schmelzkurven von tRNA und deren Auswertung

Die sogenannten Schmelzkurven, also die nicht-lineare

Änderung der Extinktion einer tRNS-Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur, wurden in einem Gilford Spectrophotometer 2400-S, das mit einem Thermoprogrammer ausgestattet war, aufgenommen. Die tRNS-Proben, deren $E_{260\text{nm}}$ um 0,5 betrug, wurden ausgiebig gegen den Puffer, der für das entsprechende Experiment benötigt wurde, dialysiert. Dazu wurden nur Dialyseschläuche verwendet, die vorher in 50 mM EDTA, pH 8,9, gekocht und dann ausgiebig mit bidestilliertem Wasser gespült wurden. Die tRNS-Proben wurden dann mit dem elektronischen Thermoprogrammer-System auf die entsprechende Ausgangstemperatur gebracht und bei dieser Temperatur die Extinktionen bei Wellenlängen von 260, 268 und 280 nm gemessen. Dann wurden die Probenlösungen gleichzeitig mit einer Pufferreferenz mit 0,5 °C/Min. erhitzt und die Temperatur sowie die Extinktionszunahme bei 268 nm registriert. Die Extinktion wurde bei 268 nm gemessen, da bei dieser Wellenlänge die Extinktionsänderungen durch Schmelzen von (G - C)-Basenpaaren und (A - U)-Basenpaaren quantitativ gleichmäßig erfaßt werden (17). Es wurde in Vorversuchen sichergestellt, daß die mittlere Schmelztemperatur, T_m , unabhängig von der Wellenlänge ist, bei der gemessen wurde. Außerdem wurde die Reversibilität der temperaturabhängigen Extinktionstransition geprüft, indem die tRNS-Proben wieder auf die Ausgangstemperatur

gebracht und erneut die Extinktion bei den angegebenen Wellenlängen gemessen wurde. Unter den beschriebenen Bedingungen war die Resthyperchromie in allen Versuchen kleiner als 3 %. Die so erhaltenen Schmelzkurven wurden auf der Basis folgender Überlegungen ausgewertet (18): Die temperaturabhängige Extinktionstransition (ΔE) ist Ausdruck des Aufbrechens von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Basenpaaren. Dieser Vorgang erfolgt nach dem Prinzip "Alles-Oder-Nichts", so daß im Temperaturbereich der Extinktionstransition die tRNS-Moleküle in der Lösung entweder im vollständig gefalteten Zustand (A) vorliegen, d.h. alle möglichen Wasserstoffbrückenbindungen sind ausgebildet, oder sie sind vollständig entfaltet (B), d.h. alle möglichen Wasserstoffbrückenbindungen sind aufgebrochen. Während des gesamten Erhitzungsvorganges, also nicht nur im Temperaturbereich der sprunghaften Transition, finden Extinktionsänderungen statt, die nicht dem "Alles-Oder-Nichts"-Verhalten folgen und im wesentlichen auf Änderungen in der Feinwechselwirkung zwischen den übereinander gestapelten, heterozyklischen Stickstoffbasen, dem sogenannten stacking, zurückzuführen sind. Diese Extinktionsänderungen sind außerhalb des Transitionsbereiches annähernd linear von der Temperatur abhängig, und es wird deshalb in erster Approximation angenommen, daß diese Abhängigkeit auch

für den Transitionsbereich gilt. Wenn die temperaturabhängige Extinktionstransition nur das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen repräsentieren soll, müssen für ihre quantitative Betrachtung die linearen Extinktionsänderungen bei jeder Temperatur abgezogen werden. Dies wird erreicht durch lineare Extrapolation der Extinktionsänderungen im gefalteten (ΔE_A) und entfalteten Zustand (ΔE_B), wie in der Skizze dargestellt.



Der Anteil der Moleküle im entfalteten Zustand B ist dann definiert durch $f_u = (\Delta E - \Delta E_A) / (\Delta E_B - \Delta E_A)$, und der Anteil der Moleküle im gefalteten Zustand A ist dementsprechend $(1 - f_u)$. Zwischen den beiden allein möglichen Zuständen A und B besteht bei jeder Temperatur T das Gleichgewicht $K_{app} = f_u / (1 - f_u)$, wobei K_{app} die Gleichgewichtskonstante darstellt. Die Änderung der Standard-Enthalpie wird durch die Van't Hoff-Gleichung definiert als $\Delta H^0 = - R [\partial \ln K_{app} / \partial (T^{-1})]_p$. Da in erster Näherung ΔH^0 von der Temperatur unabhängig ist, kann die Van't Hoff-Gleichung integriert werden, so daß man erhält $\lg K_{app} = - (\Delta H^0 / 2,303 R T) + \text{const.}$ Trägt man nun in einem Diagramm $\lg K_{app}$ gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur auf, so ergibt sich

(bei Temperaturunabhängigkeit) eine Gerade mit der Steigung - $\Delta H^0/2,303 R$.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung von zwei phenylalaninspezifischen tRNS-Species

In einer repräsentativen Präparation von Gesamt-tRNS aus einem definierten Gewebe läßt sich meist nicht nur je eine Species für die Adaptation der 19 Aminosäuren unterscheiden, sondern in der Population von tRNS-Molekülen, die für jeweils eine Aminosäure spezifisch sind, finden sich multiple Species, die mehr oder weniger für die Interaktion mit einem von meist mehreren für die Codierung einer Aminosäure möglichen Basentriplets spezialisiert sind. Diese tRNS-Species werden im Hinblick auf ihr Aminosäure-Akzeptorverhalten als Isoakzeptoren oder unter Berücksichtigung ihrer molekularen Individualität als Einzelspecies bezeichnet. Es wurden nun aber aus hochentwickelten Eukaryonten mehr Einzelspecies isoliert, als die Anzahl der im genetischen Code für eine Aminosäure identifizierten Triplets festlegen würde (11,19,20). Da das plurimodale Verteilungsmuster von Einzelspecies-tRNS als Ergebnis der Differenzierung eines Gewebes aufgefaßt werden kann, ist es für eine Arbeit, die sich mit phenylalaninspezifischer tRNS aus vorwiegend aus Muskulatur bestehendem Gewebe von 13 Tage

alten Hühnerembryonen beschäftigt, sinnvoll, zuerst zu untersuchen, ob mehrere Einzelspecies in diesem Gewebe zur Ausprägung kommen.

Die Chromatographie an "Reversed-Phase"-5-Matrix ist heute das Verfahren mit der höchsten Auflösung zur Trennung von Einzelspecies-tRNS (19). Abb. 2 zeigt das Ergebnis eines Versuches, bei dem 126 E_{260nm} -Einheiten einer Gesamt-tRNS-Präparation in einem RPC-5-Säulensystem mit Salzgradientenelution chromatographiert wurden. In den eluierten Fraktionen wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen und die Akzeptorkapazität für Phenylalanin bestimmt. Es ist offensichtlich, daß der größte Teil des UV-absorbierenden Materials von der Säule eluiert wird, bevor solches mit Phenylalanin-Akzeptorkapazität desorbiert wird. Die Verteilung der Phenylalanin-Akzeptorkapazität läßt zwei $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ -Species erkennen; die eine, in geringerer Menge vorhanden, $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ 1, ist nur unvollständig von der nachfolgenden, $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ 2, abgetrennt. Zwei derartige voll funktionsfähige $tRNS^{Phe}$ -Species wurden bisher nur im Fall von $tRNS^{Phe}$ aus Rattenleber (21) gefunden, obwohl eine größere Anzahl anderer eukaryoter Gewebe daraufhin untersucht wurden. Aus Abb. 2 ist weiterhin ersichtlich, daß im Bereich von $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ auch noch anderes tRNS-Material eluiert wird, denn das Extinktionsprofil entspricht nicht

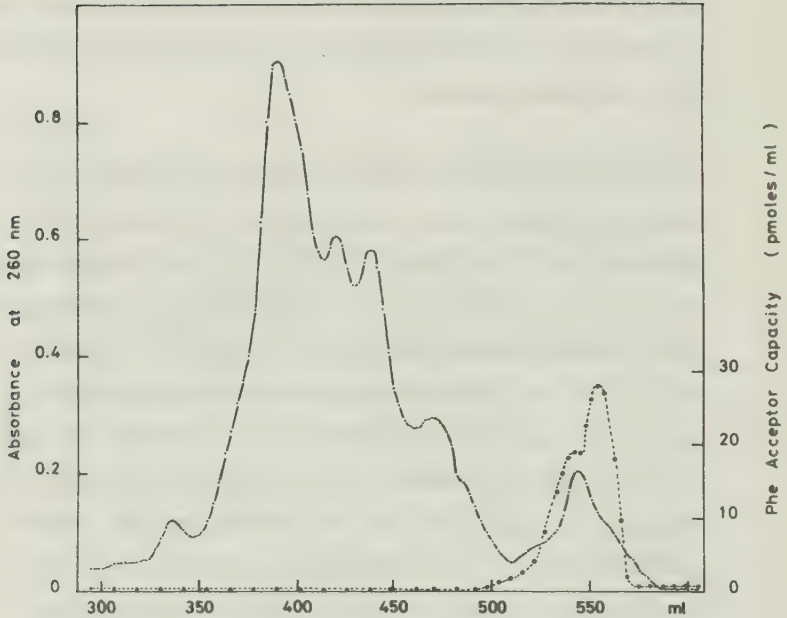


Abb. 2. Verteilung der Phenylalanin-Akzeptorkapazität nach "Reversed-Phase"-5-Chromatographie von Gesamt-tRNS aus Hühnerembryonemuskulatur.

Zwei hintereinandergeschaltete Säulen von je 0,6 x 140 cm wurden mit 0,4 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM 2-Mercaptoäthanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, äquilibriert, ungefähr 120 E_{260nm}-Einheiten adsorbiert und mit einem linearen von 0,4 - 0,8 M NaCl reichenden Gradienten im gleichen Puffer eluiert. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 1000 ml, die Durchflußgeschwindigkeit 0,3 ml/Min. (—●—●—) Extinktion bei 260 nm; (—○—○—) Phenylalanin-Akzeptorkapazität.

dem Verlauf der Phenylalanin-Akzeptorkapazität, wie es z.B. in Abb. 6a bei einer ähnlichen Chromatographie der Fall ist. Wie später gezeigt wird, lassen sich die beiden $\text{trNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ -Species im aminoacylierten Zustand auf einer RPC-5-Säule vollständig trennen. Dieser Weg wurde jedoch nicht eingeschlagen, da nur eine verhältnismäßig unreine Präparation der L-Aminosäure:trNS-Ligase(AMP) zur Verfügung stand und durch die Inkubation mit dem Enzym schwer zu kontrollierende unspezifische Veränderungen an den beiden $\text{trNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ -Species hätten hervorgerufen werden können. Für alle weiteren Experimente wurde deshalb nur, wie im Methodenteil beschrieben, hochgereinigte $\text{trNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ benutzt, die beide Species enthielt.

3.2. Fluoreszenzspektren der $\text{trNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$

Es ist bekannt, daß trNS^{Phe} aus Hefe (1), Weizenkeimen (2), Ratten- und Rinderleber (3,4) starke Fluoreszenz bei Raumtemperatur zeigen, die auf das in allen diesen Species vorhandene hydrophobe, fluoreszierende Purin Y^+ zurückzuführen ist. Um zu untersuchen, ob eine ähnlich fluoreszierende Base in $\text{trNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ aus Hühnerembryonensmuskulatur vorhanden ist, wurden entsprechende Fluoreszenzspektren von $\text{trNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ aufgenommen. Aus Vergleichen mit den bekannten Fluoreszenzdaten von trNS^{Phe} aus anderen Organismen ergibt sich, daß die auch in $\text{trNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ vorhandene fluoreszierende Base zwar ähnliche aber

doch deutlich unterschiedliche fluoreszenzspektrophotometrische Eigenschaften hat. Das Anregungsspektrum (Abb. 3a) von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ hat keine Schultern oder zusätzliche

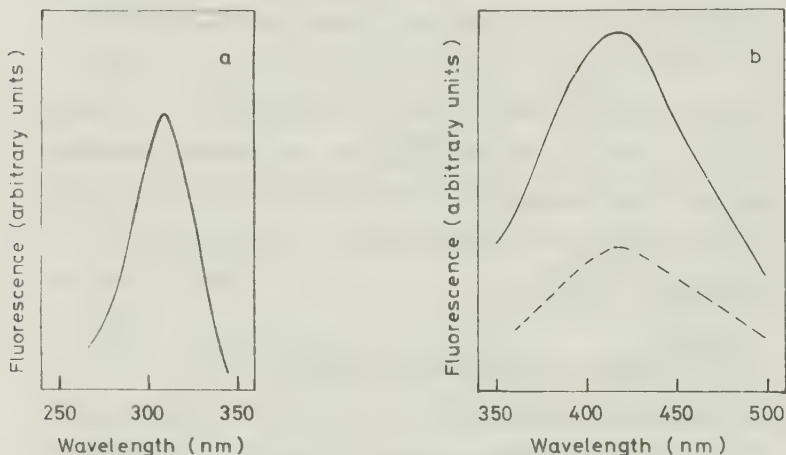


Abb 3. Fluoreszenzspektren von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$.

(a) Anregungsspektrum für die Messung der Emission bei 420 nm;

(b) Abstrahlungsspektrum für Exzitation bei 310 nm.

$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ ($E_{260 \text{ nm}} = 2,17$) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, ohne MgCl_2 (---) und mit zusätzlich 10 mM MgCl_2 (—).

Maxima auf der kurzwelligen Seite zwischen 250 und 280 nm, wie sie für tRNS^{Phe} -Species aus den anderen Organismen bekannt sind, und das Maximum der Exzitation liegt bei 310 nm (Tabelle 1) im Vergleich zu 322 nm (Rinderleber), 310 nm (Rattenleber) und 318 nm (Hefe). Das Maximum der Emission ist bei 420 nm (Abb. 3a und Tabelle 1), für tRNS^{Phe} aus Hefe und Rattenleber sind 430 nm berichtet. Durch Anwesenheit von Mg^{++} in der tRNS -Lösung läßt sich wie bei tRNS^{Phe} aus Rattenleber auch für $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ die Fluoreszenzintensität auf mehr als das Doppelte steigern (Abb. 3b).

3.3. Isolierung und Charakterisierung der $\text{Y}_{\text{ChEm}}^{+}$ -Base
Aufgrund dieser Fluoreszenzspektren war anzunehmen, daß auch in $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ ein hochmodifiziertes, hydrophobes, fluoreszierendes Purin $\text{Y}_{\text{ChEm}}^{+}$, wie bei den bereits erwähnten tRNS^{Phe} -Species dem Anticodon 3'-benachbart, vorkommt. Für tRNS^{Phe} aus Hefe und Rattenleber (7,22) ist beschrieben worden, daß diese Purinbase durch milde Säurebehandlung von der tRNS abspaltbar ist, ohne daß die Phosphodiester-Ribose-Kette zerbrochen wird. Die freie Base kann dann wegen ihrer hydrophoben Eigenschaften mit Chloroform aus der Lösung extrahiert werden. Die Säurebehandlung von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und weitere Experimente zur Charakterisierung von $\text{Y}_{\text{ChEm}}^{+}$ wurden in enger Anlehnung an die experimentellen Bedingungen, wie sie für die

Tabelle 1. Spektrophotometrische Charakterisierung von Y^{+}_{ChEm} und $trNS^{Phe}_{ChEm}$

	Fluoreszenz		Ultraviolett-Extinktion von Y^{+}_{ChEm}			
	Excitation λ_{max} (nm) Y^{+}_{ChEm} $trNS^{Phe}_{ChEm}$	Emission λ_{max} (nm) Y^{+}_{ChEm} $trNS^{Phe}_{ChEm}$	λ_{max_1} (nm)	λ_{min} (nm)	λ_{max_2} (nm)	$\frac{E_{240nm}}{E_{260nm}}$ $\frac{E_{250nm}}{E_{260nm}}$ $\frac{E_{280nm}}{E_{260nm}}$
pH						
1,0	265 -	350 -	213	244	260	0,88 0,91 0,69
7,0	- 310	- 420	213	244	260	0,93 0,94 0,74
9,9	- -	- -	213	253	276	1,14 0,97 1,06
11,0	300 -	405 -	213	254	285	1,21 0,99 1,17

Abspaltung von Y^+ aus $\text{tRNS}_{\text{Hef}}^{\text{Phe}}$ beschrieben worden sind, durchgeführt, um Ergebnisse direkt vergleichen zu können. Tatsächlich konnte auch aus $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ unter den angegebenen Bedingungen eine mit Chloroform extrahierbare fluoreszierende Verbindung, Y_{ChEm}^+ , abgespalten werden. Diese Verbindung wurde weiter durch absteigende Papierchromatographie gereinigt. Hierbei wurde ein R_F von 0,84 ermittelt, der R_F -Wert für Adenin, das gleichzeitig chromatographiert wurde, war 0,58. Auf Cellulose-Dünnschichtplatten war unter den angegebenen Bedingungen der R_F von Y_{ChEm}^+ 0,81, während der entsprechende R_F -Wert für das cochromatographierte Adenin 0,38 war.

Extinktionsspektrophotometrische Untersuchungen im UV können, wenn sie in Abhängigkeit vom pH der zu messenden Lösung durchgeführt werden, Auskunft über die Anzahl der ringständigen protonierten Gruppen einer heterozyklischen Stickstoffbase geben, da UV-Extinktionsspektren in erster Annäherung den Status der π -Elektronen in diesen Verbindungen repräsentieren (23). Verliert eine ringständige NH-Gruppe durch Abnahme der H^+ -Ionenkonzentration in der Lösung ihr Proton, so ändert sich das Verhalten der π -Elektronen im Ring und damit auch die Qualität des Spektrums. In welchen Positionen im Heterozyklus Purinbasen protoniert werden, ist letztlich nicht eindeutig geklärt, jedoch scheinen

die Positionen N 1, N 3, N 7 und N 9 bevorzugt zu sein. Man findet für Purinabkömmlinge, die nicht in diesen Positionen substituiert sind, normalerweise 3 pK-Werte, den ersten (pK ungefähr 2 - 3,5) beim Übergang von der kationischen in die Neutralform, den nächsten (pK ungefähr 8 - 11) beim Übergang von der Neutralform zum Anion und den dritten (pK ungefähr 12 - 13,5) vom Anion zum Dianion (19). In Abb. 4 sind UV-Extinktionsspektren bei pH 1,0, 7,0, 9,9 und 11,0 wiedergegeben. In diesem pH-Bereich ändert sich die Wellenlänge des ersten Maximums nicht, während das zweite Maximum bei pH 1,0 und pH 7,0 bei 260 nm liegt und sich aber bei pH 11,0 nach 285 nm verschoben hat. Ein drittes Extinktionsmaximum jenseits von 300 nm, wie es für Y^+ aus Hefe beschrieben worden ist, fehlt im Spektrum von Y_{ChEm}^+ . Das Verhältnis aus den Extinktionen bei 280 nm und 260 nm von 0,74 bei pH 7,0 (Tabelle 1) spricht dafür, daß Y_{ChEm}^+ eher ein Guaninabkömmling als ein Adeninderivat ist. Y^+ aus Hefe wurde in letzter Zeit eindeutig als Guaninderivat identifiziert (24). Bei der Auswertung von 13 UV-Extinktionsspektren im pH-Bereich von 1,0 - 13,0 wurde für Y_{ChEm}^+ nur ein pK von ungefähr 9,5 gefunden. Alle anderen protonierbaren Gruppen sind also durch Substituenten besetzt.

In den Fluoreszenzspektren von Y_{ChEm}^+ , die in Abb. 5 a und 5 b dargestellt sind, zeigen die jeweiligen Maxima

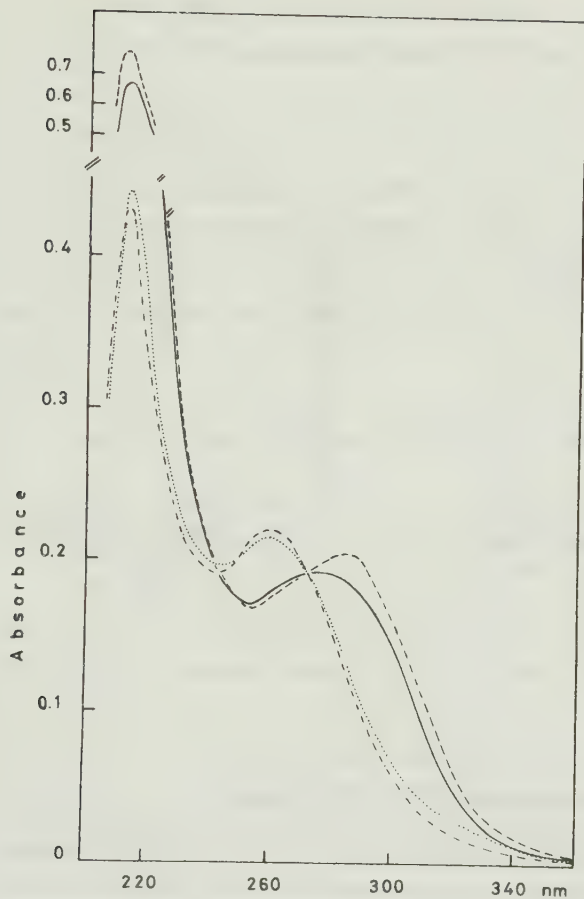


Abb. 4. Ultraviolett-Extinktionsspektren von Y_{ChEm}^+ .
 (—●—●—) bei pH 1,0 (in 0,1 N HCl); (••••••••) bei
 pH 7,0 (in 0,01 M Ammoniumacetat); (————) bei
 pH 9,9 (in 10 mM Tris-HCl); (— — — —) bei pH 11,0
 (in 0,1 N NH_4OH).

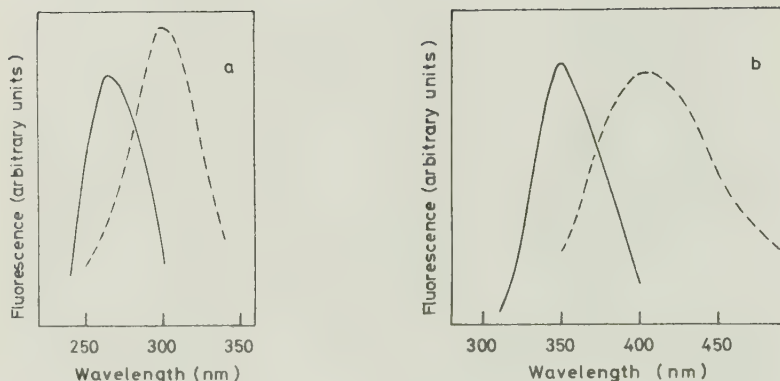


Abb. 5. Fluoreszenzspektren von Y_{ChEm}^+ .

(a) Exzitationsspektren bei pH 1,0 für Messung der Abstrahlung bei 350 nm (—) und bei pH 11,0 für Messung der Abstrahlung bei 405 nm (---); (b) Emissionsspektren bei pH 1,0 für Anregung bei 265 nm (—) und bei pH 11,0 für Anregung bei 300 nm (---).

Y_{ChEm}^+ entweder in 0,1 N HCl oder in 0,1 NH_4OH
($E_{260\text{ nm}} = 0,62$).

eine ähnliche pH-abhängige Rotverschiebung wie das zweite UV-Extinktionsmaximum (Tabelle 1). Zu beachten ist, daß sich Exzitations- und Emissionsmaximum der isolierten Base im Vergleich zu den Daten, die mit $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ gewonnen wurden, deutlich in den kürzeren Wellenlängenbereich verschoben haben. Entsprechende Daten bei pH 7,0 konnten nicht gewonnen werden, da starke Lichtstreuungseffekte die Fluoreszenzspektren störten.

3.4. Vergleichende Charakterisierung von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$

3.4.1. Chromatographisches Verhalten und biologische Aktivität

Wenn phenylalaninspezifische tRNS aus Hefe, Ratten- oder Rinderleber an benzoylierter DEAE-Cellulose chromatographiert wird, so ist die Bindung an dieses Säulenmaterial, bei dem der dominierende Trenneffekt die Interaktion zwischen den säulengebundenen Benzoylgruppen und den hydrophoben Stickstoffbasen im tRNS-Molekül ist, so stark, daß diese tRNS-Species erst von der Säule eluiert werden, wenn dem hochkonzentrierten Salzgradienten Äthanol zugesetzt wird. Dieser Effekt wurde von einigen Autoren (12, 22) allein der hydrophoben, fluoreszierenden γ^+ -Base in den vorher genannten $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ -Species zugeschrieben. Vor einiger Zeit gelang es nun FAIRFIELD und BAR-

NETT (25) nachzuweisen, daß die cytoplasmatische tRNS^{Phe} aus *Neurospora crassa*, obwohl sie eine fluoreszierende Y^+ -Base enthält, allein durch hohe Salzkonzentration von BD-Cellulose desorbiert werden kann. Beim ersten Schritt zur Reinigung von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$, der Chromatographie an BD-Cellulose, war es möglich, diese Species auch allein mit Salz zu eluieren, obwohl sie, wie schon gezeigt, ebenfalls eine fluoreszierende, hydrophobe Base Y_{ChEm}^+ enthält. Bei der Chromatographie von tRNS aus Hühnerembryonemuskulatur im RPC-5-System (Abb. 2) wurde die phenylalaninspezifische tRNS -Species als eine der letzten eluiert. Der dominierende Trenneffekt dieses Chromatographiesystems ist ebenfalls auf Adsorptions-Desorptions-Vorgänge an einem hydrophoben, inerten Harz zurückzuführen. Es ist deshalb zu erwarten, daß sich nach Abspaltung von Y_{ChEm}^+ das chromatographische Verhalten des tRNS -Moleküls, $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP), ändert. Abb. 6a zeigt die "Reversed-Phase"-5-Chromatographie von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ nach Säurebehandlung. Extinktionsmessungen bei 260 nm in den jeweiligen eluierten Fraktionen ergaben zwei vollständig voneinander getrennte Verteilungen von UV-absorbierendem Material. Parallel dazu durchgeführte Bestimmungen der Akzeptorkapazität für ^{14}C -markiertes Phenylalanin zeigten, daß nur das Material der zweiten, mengenmäßig geringeren Verteilung Phenylalanin-Akzeptorkapazität hat. Diese folgt aller-

dings genau dem Profil der E_{260nm} -Messungen und zeigt eine ähnliche Zweifachverteilung wie die native $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ in Abb. 2. Hieraus wurde vermutet, daß es sich bei dem mit Phenylalanin beladbaren Material um die durch Säurebehandlung unverändert gebliebene $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ handelt, während das nicht-beladbare, UV-absorbierende Eluat $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ nach Abspaltung der Y_{ChEm}^+ -Base, also $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (AP), repräsentiert. Diese Interpretation wurde durch die Ergebnisse von Fluoreszenzmessungen in den beiden Verteilungen unterstützt: Das Material der zuerst eluierten Verteilung hatte seine Fluoreszenzeigenschaft verloren, während mit dem $tRNS$ -Material des zweiten Gipfels Fluoreszenzspektren mit den gleichen charakteristischen Daten, wie sie für $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ ermittelt wurden, aufgenommen werden konnten. Als Kontrollversuch wurde ein Doppelmarkierungsexperiment durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abb. 6b wiedergegeben sind. Nicht säurebehandelte, mit ^{14}C -markiertem Phenylalanin beladene $Phe-tRNS_{ChEm}^{Phe}$ und säurebehandelte, mit 3H -markiertem Phenylalanin beladene $Phe-tRNS_{ChEm}^{Phe}$ wurden zusammen auf einer RPC-5-Säule chromatographiert und die ^{14}C - und 3H -Radioaktivität in den eluierten Fraktionen gemessen. Der direkte Vergleich der Abb. 6a mit 6b, zwischen Experimenten also, die unter identischen säulenchromatographischen Bedingungen durchgeführt wurden, zeigt, daß die aminoacy-

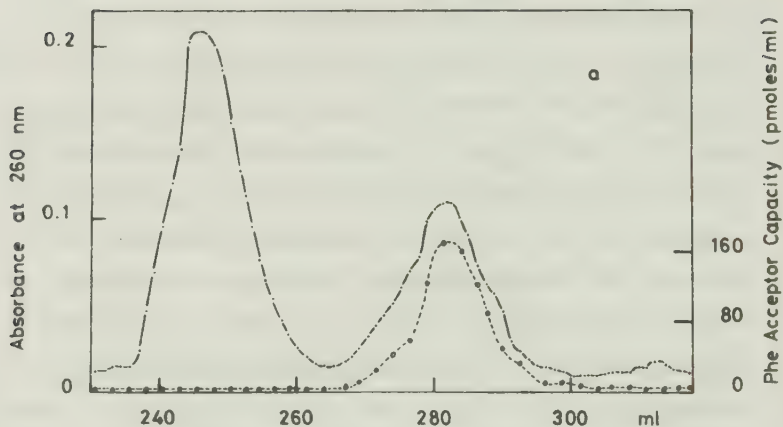


Abb. 6a. "Reversed-Phase"-5-Chromatographie von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ nach Säurebehandlung.

Eine Säule von 0,6 x 140 cm wurde mit 0,4 M NaCl, 10 mM MgCl_2 , 2 mM 2-Mercaptoäthanol, 10 mM Essigsäure, pH 5, äquilibriert und 8 $E_{260\text{nm}}$ -Einheiten säurebehandelter $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ adsorbiert. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 0,4 - 1,0 M NaCl im gleichen Puffer. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 500 ml, die Durchflußgeschwindigkeit 0,3 ml/Min. (—●—●—) Extinktion bei 260 nm; (—○—○—) Phenylalanin-Akzeptorkapazität.

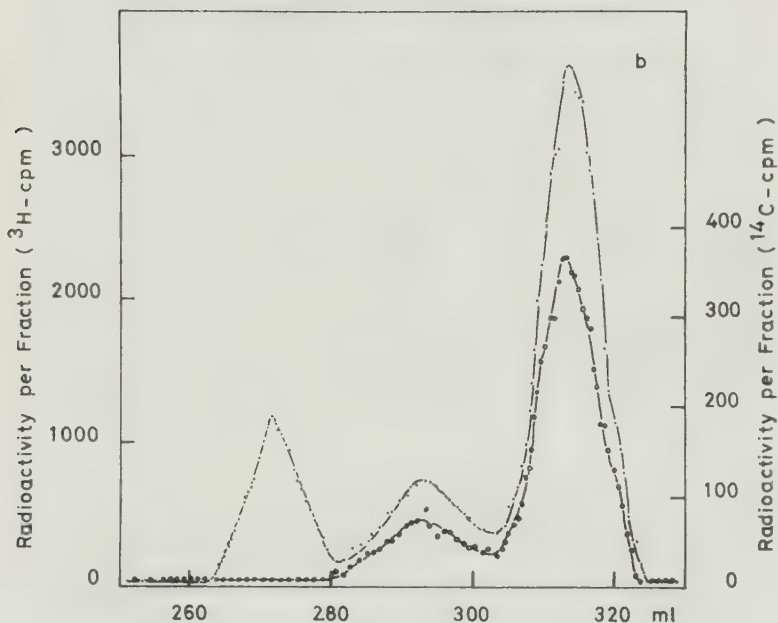


Abb. 6b. "Reversed-Phase"-5-Chromatographie von $\text{Phe-tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und säurebehandelter $\text{Phe-tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$. 3 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten von mit ^{14}C -markiertem Phenylalanin aminoacylierter $\text{Phe-tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (—○—○—) und 10 $\text{E}_{260\text{nm}}$ -Einheiten von säurebehandelter und mit ^3H -markiertem Phenylalanin aminoacylierter $\text{Phe-tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (—●—●—) wurden gemeinsam unter den gleichen Bedingungen wie zu Abb. 6a angegeben chromatographiert.

lierten $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ -Species länger als die unbeladenen auf der Säule zurückgehalten werden. Dies ist möglicherweise auf Interaktionen der aromatischen Phenylalanin-Gruppe mit der Polychlorotrifluoroäthylenmatrix des RPC-5 Materials zurückzuführen. Es wurde schon zu Anfang erwähnt, daß sich im aminoacylierten Zustand die beiden phenylalaninspezifischen $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ -Einzelspecies, $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}} 1$ und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}} 2$, durch RPC-5 voneinander trennen lassen. Dies zeigt der Verlauf der ^{14}C -Radioaktivität von nicht säurebehandelter Phe- $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ deutlich. Diese Verteilung der beiden Einzelspecies ist folgerichtig auch im ^3H -Radioaktivitätsprofil der säurebehandelten Phe- $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ zu erkennen. Vor diesen beiden Verteilungen wird jedoch ^3H -markiertes Material eluiert, das durch die Säurebehandlung entstanden sein muß, nämlich Phe- $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP). Im Vergleich zu dem in 6a abgebildeten Experiment ist die Ausbeute an $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) sehr viel geringer. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Säurebehandlung von aminoacylierter tRNS, wie im Methodenteil beschrieben, bei hoher Ionenstärke durchgeführt werden muß, um während der experimentellen Prozeduren die Aminoacylbindung möglichst stabil zu halten. THIEBE und ZACHAU berichten dazu (7), daß im Fall von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ aus Hefe die Abspaltung der Y^+ -Base schon bei Salzkonzentrationen über 0,2 M sehr viel weniger effektiv ist.

Ein Ergebnis dieser Versuche, daß nämlich $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ nicht mit Phenylalanin beladbar ist, steht im Gegensatz zu entsprechenden Experimenten mit tRNS^{Phe} aus Hefe, die nach Abspaltung der Y^+ -Base die gleiche Phenylalanin-Akzeptorkapazität wie das native tRNS-Molekül hat (7). Es wurde vermutet, daß der Verlust von Y_{ChEm}^+ allein nicht zu diesem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität geführt haben konnte, sondern daß das Molekül bei der Säurebehandlung im Gegensatz zur tRNS^{Phe} aus Hefe andere Veränderungen erfahren hatte. Es wurden deshalb Versuche unternommen, die diese weiteren Veränderungen in $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ aufklären sollten.

3.4.2. Sedimentationskoeffizienten

Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ in der Analytischen Ultrazentrifuge wurde unter Ionenbedingungen durchgeführt, die ausreichend sind, um die native Konformation von intakter tRNS zu gewährleisten. Für $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ wurde dann auch der zu erwartende Sedimentationskoeffizient von 4,0 S ermittelt, während für $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ nur 2,8 S gefunden wurde. Dies kann nach der Svedberg-Gleichung (26) bedeuten, daß sich entweder das Molekulargewicht des untersuchten Moleküls erheblich verringert hat oder daß es eine stark entfaltete Konformation eingenommen und damit seine Friktion gegen-

über dem Lösungsmittel vergrößert hat. Für ein reduziertes Molekulargewicht von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) sprachen zunächst auch Ergebnisse von WINTERMEYER und ZACHAU (27). Diese Autoren konnten nämlich zeigen, daß es nach Abspaltung der Y^+ -Base aus tRNS^{Phe} von Hefe unter bestimmten Bedingungen, nämlich alkalischer pH und hohe Mg^{++} -Konzentration, zur Spaltung der Polynucleotidkette an der Stelle der Y^+ -Eliminierung kommen kann.

3.4.3. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Der Nachweis von Halbmolekülen, der mit chromatographischen Methoden erheblichen Aufwand verlangt (28), gelingt mit der Elektrophorese in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen mit geringen tRNS-Mengen in kurzer Zeit (29). Es wurden deshalb jeweils tRNS-Proben nach den einzelnen Schritten der Säurebehandlung und insbesondere in Abhängigkeit von der Inkubationszeit diesen Elektrophoresebedingungen unterworfen. In keinem dieser Versuche wurde die Bildung von Halbmolekülen beobachtet. In Abb. 7 sind die densitometrischen Profile von drei repräsentativen Gelen nach Elektrophorese wiedergegeben. Aus Abb. 7a und 7b ist ersichtlich, daß intakte $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) nach Elektrophorese in gleicher Position sind. Auch eine Kombination aus gleichen Mengen beider Präparate (Abb. 7c) zeigt densitometrisch keine Dop-

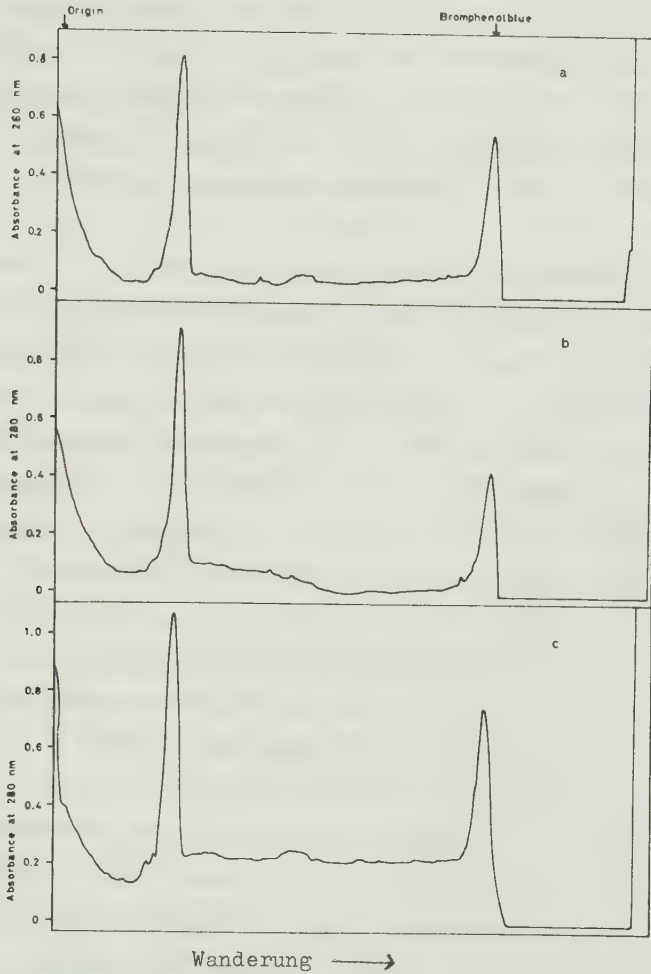


Abb. 7. Diskelektrophorese von $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ in Polyacrylamidgelen mit 7 M Harnstoff.
 (A) $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$; (B) $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$; (C) äquimolare Mischung aus (A) und (B). Auf jedes Gel wurden ca. $0,45 E_{260\text{nm}}^-$ Einheiten der jeweiligen Probe gegeben.

pelverteilung und hat nach der Elektrophorese die gleiche Wanderungsstrecke wie $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ zurückgelegt. Dieser Versuch zeigt eindeutig, daß der beobachtete reduzierte Sedimentationskoeffizient von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) nicht auf einer Verringerung des Molekulargewichts beruht.

3.4.4. Thermische Denaturierung

Konformationsunterschiede zwischen tRNS-Molekülen, wie sie nach den oben beschriebenen Versuchen auch für $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{I}^{\text{he}}}$ (AP) angenommen werden müssen, äußern sich in ihrem temperaturabhängigen Übergang von dem durch Wasserstoffbrückenbindungen vermittelten doppel-helikalen gefalteten Zustand zum entfalteten, der durch die temperaturabhängige Extinktionszunahme verfolgt werden kann. Der sogenannte "Schmelzpunkt" T_m ist der Mittelpunkt der Extinktionstransition. Er ist abhängig von der qualitativen Basenzusammensetzung des tRNS-Moleküls und wesentlich von der Konzentration von ein- und zweiwertigen Kationen, die die jeweilige Molekülkonformation stabilisieren. Die unter der thermodynamischen Vorstellung eines "Alles-Oder-Nichts"-Verhaltens des Konformationsüberganges errechneten Werte für die Wärmetönung, ΔH^0 , sind unter identischen Ionenbedingungen ein Maß für die Anzahl der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen und anderen konformationsstabilisierenden Einflüssen. Die beim Konformationsübergang

zu messende Hyperchromie ist abhängig von der Anzahl der über Wasserstoffbrücken gepaarten Basen bezogen auf die Gesamtzahl der Basen im Molekül. Abb. 8a zeigt Schmelzkurven von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$. Dabei wird, wie im Methodenteil beschrieben, die Entfaltung in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Abb. 8b zeigt die entsprechenden Kurven in Differentialform. Aus beiden Abbildungen geht der stabilisierende Effekt von Mg^{++} -Ionen auf die Konformation von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ hervor, denn in Anwesenheit von Mg^{++} wird der Schmelzpunkt T_m deutlich erhöht und die Steilheit der Kurven beider Darstellungen nimmt zu. Abb. 9 zeigt Van't Hoff-Darstellungen, die Temperaturabhängigkeit von K_{app} , der Gleichgewichtskonstanten zwischen den beiden Zuständen B (Anteil f_u) und A (Anteil $1 - f_u$). Aus Abb. 9 geht hervor, daß im gemessenen Temperaturbereich diese Abhängigkeit in allen Fällen linear war, d.h. H^0 war in erster Annäherung unabhängig von der Temperatur. Deshalb war es zulässig, ΔH^0 aus der Steigung dieser Geraden zu berechnen (siehe Methodenteil). Alle Daten aus den abgebildeten Schmelzkurven sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Als Referenzwert für den späteren Vergleich mit der $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ wurden zuerst die entsprechenden Daten für $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ in Anwesenheit von Mg^{++} - und ohne Mg^{++} -Ionen ermittelt. Die Werte für T_m , Hyperchromie und Enthalpie zeigen, daß $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ ohne Mg^{++} (Reste von Mg^{++}

werden durch EDTA komplexiert) eine labilisierte Tertiärstruktur aufweist, denn alle drei Werte sind gegenüber denen der Mg^{++} -stabilisierten Struktur deutlich reduziert. $tRNS_{ChEm}^{Phe}(AP)$, unter den gleichen Bedingungen ohne Mg^{++} erhitzt, weist einen sehr niedrigen T_m und nur einen Rest an Hyperchromie auf, während die Wärmetönung der von $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ entspricht. Wurde nun aber in der auf $50^\circ C$, also weit über den T_m , erhitzten $tRNS_{ChEm}^{Phe}(AP)$ -Lösung eine Mg^{++} -Konzentration von 50 mM eingestellt, diese Lösung langsam über drei Stunden bei Raumtemperatur abgekühlt und erneut eine Schmelzkurve aufgenommen, so konnten jetzt Werte für T_m , Hyperchromie und ΔH^0 gemessen werden, die denen einer vollkommen ausgebildeten dreidimensionalen $tRNS$ -Struktur bei dieser hohen Mg^{++} -Konzentration entsprechen würden. Wenn diese $tRNS_{ChEm}^{Phe}(AP)$ -Lösung durch Dialyse gegen die entsprechenden Puffer auf eine Mg^{++} -Konzentration von 5 bzw. 3 mM gebracht wurde, so konnte die gleiche Abhängigkeit des T_m -Wertes und der Hyperchromie von der Mg^{++} -Konzentration, wie sie zu Anfang diese Abschnittes für $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ gezeigt wurde, nachgewiesen werden. Auch die Absolutwerte waren nun wieder denen von $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ ähnlich, doch dies nur bei einer ungefähr 10 mal höheren Mg^{++} -Konzentration, als für $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ erforderlich.

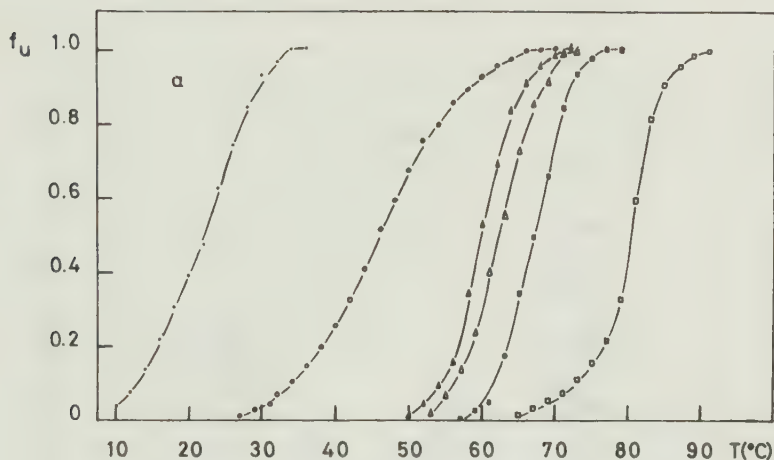


Abb. 8a. Schmelzkurven von $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP). Der Anteil der entfalteten Moleküle f_u , wie im Methoden-
teil definiert, aufgetragen gegen die Temperatur:
1. (—▲—▲—) native $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ in Gegenwart von 0,5 mM MgCl_2 ; 2. (—○—○—) native $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ in Gegenwart von 1 mM EDTA; 3. (—●—●—) $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) in Gegenwart von 1 mM EDTA; 4. (—□—□—□—) $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) nach Erhitzen auf 50 °C und langsamem Abkühlen in Gegenwart von 50 mM MgCl_2 , dann Schmelzen in Gegenwart von 50 mM MgCl_2 ; 5. (—Δ—Δ—) $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) wie bei 4. vorbehandelt, Schmelzen jedoch in Gegenwart von 3 mM MgCl_2 ; 6. (—■—■—) $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) vorbehandelt wie bei 4., Schmelzen dann in Gegenwart von 5 mM MgCl_2 . Weitere Einzelheiten sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

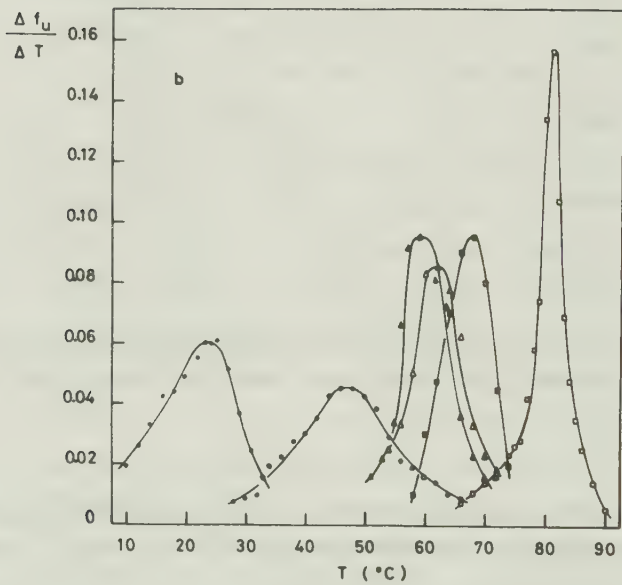


Abb. 8b. Differentialform der in Abb. 8a dargestellten Schmelzkurven.

Symbole und die dazugehörigen Bedingungen entsprechen denen der Abb. 8a.

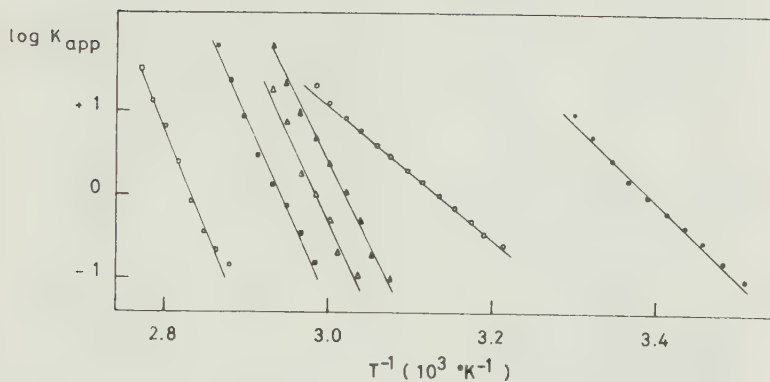


Abb. 9. Van't Hoff-Darstellungen der aus den Schmelz-
kurven von $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ und $tRNS_{ChEm}^{Phe}(AP)$ erhältlichen Daten.
Symbole und die dazugehörigen Bedingungen korrespondie-
ren mit denen der Abb. 8a.

Tabelle 2. Bedingungen und Parameter des Schmelzens von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$.

$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}$ Probe	Puffer	Hyper- chromie (%)	T_m (°C)	ΔH° (kcal/Mol)	Bemerkungen zur Vorbehand- lung der Proben
$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$	0,5 mM MgCl_2 , 10 mM Na-Cacodylat, pH 6,8	23,6	59	83	
$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$	1 mM EDTA, 10 mM Na-Cacodylat, pH 6,8	13,4	46	37	Schmelzkurven aufgenommen nach ausgiebiger Dialyse gegen Puffer
$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$	1 mM EDTA, 10 mM Na-Cacodylat, pH 6,8	4,2	22	38	
$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$	50 mM MgCl_2 , 10 mM Na-Cacodylat, pH 6,8	22	80	116	MgCl_2 hinzugefügt bei 50 °C Schmelzkurven nach langsa- mem Abkühlen aufgenommen
$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$	5 mM MgCl_2 , 10 mM Na-Cacodylat, pH 6,8	22,8	67	83	Schmelzkurven aufgenommen nach ausgiebiger Dialyse der vorherigen Probe ge- gen Puffer
$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$	3 mM MgCl_2 , 10 mM Na-Cacodylat, pH 6,8	18,6	62	83	

3.5. "Renaturierung" von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$

Es sind für einige tRNS -Species aus *E.coli* und Hefe sogenannte denaturierte Formen beschrieben worden (30,31), die durch Abkühlen bei niedriger Ionenstärke (ohne Mg^{++}) entstehen, in diesem Zustand stabil gehalten werden können und die ebenfalls keine Aminosäure-Akzeptorkapazität besitzen. Diese denaturierten Species können durch Erhitzen unter individuell verschiedenen Mg^{++} -Konzentrationen ihre native Struktur und damit ihre Aminoacylierbarkeit wiedererlangen. Es war deshalb naheliegend, zu untersuchen, ob $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ unter den im vorigen Kapitel beschriebenen, in gewisser Weise ähnlichen Renaturierungsbedingungen eine dreidimensionale Struktur zurückerlangt hat, die nicht nur vom Schmelzpunkt her nativer $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ sehr ähnlich ist, sondern auch ihre biologische Funktion wiedererlangt hat. In Abb. 10 ist wiedergegeben, daß $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$, auch bei mehreren Mg^{++} -Konzentrationen getestet, keine Phenylalanin-Akzeptorkapazität besitzt. Im Vergleich dazu ist die spezifische Phenylalanin-Akzeptorkapazität von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ dargestellt. Nachdem aber, wie beschrieben, $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ auf 50 °C erhitzt worden war und in 50 mM Mg^{++} langsam abgekühlt wurde, konnte, wie in Abb. 10 dargestellt, Phenylalanin-Akzeptorkapazität wieder nachgewiesen werden. Um auszuschließen, daß die sichtbar langsamer verlaufende Aminoacylierungs-

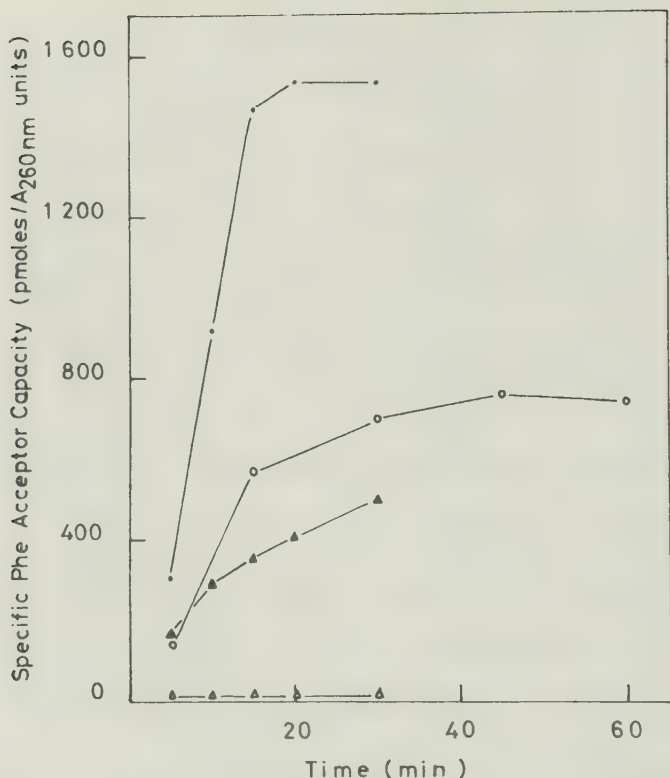


Abb. 10. Zeitabhängigkeit der Aminoacylierung von

$\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$.

1. (—●—●—) native $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ in Anwesenheit von 5 mM MgCl_2 ;
 2. (—△—△—) $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ nach Elution von RPC-5, wie in Abb. 6a dargestellt, in Gegenwart von jeder der folgenden MgCl_2 -Konzentrationen: 5 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM (gezeigt Mittelwerte); 3. (—▲—▲—) $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ nach Erhitzen auf 50 °C und langsamem Abkühlen in Gegenwart von 50 mM MgCl_2 , dann Aminoacylierungstest in Gegenwart von 50 mM MgCl_2 ; 4. (—○—○—) $\text{tRNA}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ wie in 3. vorbehandelt; dann Aminoacylierungstest in Gegenwart von 5 mM MgCl_2 . Alle Aminoacylierungstests wurden bei 20 °C durchgeführt.

reaktion auf einer Enzymhemmung durch die hohe Mg^{++} -Konzentration im Reaktionsansatz beruhte, wurde der gleiche Versuch mit den schon zu den Schmelzversuchen benutzten $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (AP)-Proben wiederholt, die von 50 mM Mg^{++} auf 5 mM Mg^{++} umdialysiert worden waren. Die Aminoacylierung verlief jetzt zwar etwas schneller, es wurde aber trotzdem nur maximal die Hälfte der Akzeptorkapazität von $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ erreicht.

Eingedenk der Tatsache, daß die in der Literatur beschriebenen denaturierten tRNS-Species aus *E. coli* nur durch individuelle Renaturierungsmaßnahmen ihre native Struktur wiedererlangen konnten, wurde auch für $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (AP) sowohl die Temperaturabhängigkeit der Renaturierung als auch deren Abhängigkeit von der Mg^{++} -Konzentration untersucht. Diese Versuche sind in Abb. 11 dargestellt. Es sind zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente wiedergegeben, das eine mit einer reinen $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (AP)-Präparation, von der nach der Säurebehandlung übriggebliebene native $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ auf einer RPC-5-Säule abgetrennt wurde, das andere mit einer Mischung aus beiden Species direkt nach der Säurebehandlung. In dieser zweiten Präparation war dementsprechend noch eine gewisse Aminoacylierungskapazität vorhanden, die auf unveränderte $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ zurückzuführen ist. Die genauen Versuchsbedingungen sind in der Legende zu Abb. 11 beschrieben. Diese Versuche ergaben, daß zur

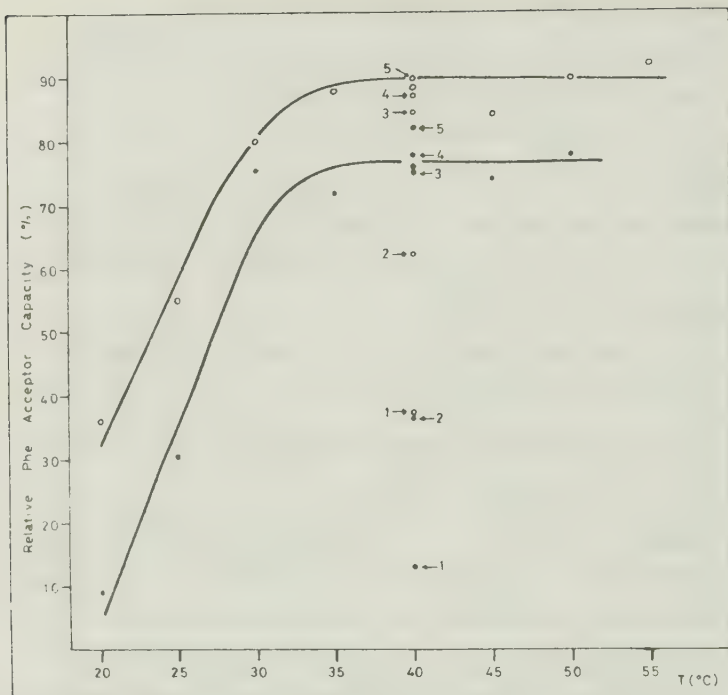


Abb. 11. Wiederherstellung der Phenylalanin-Akzeptor-kapazität von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) in Abhängigkeit von Temperatur und MgCl_2 -Konzentration.
 (—○—○—) Proben von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ nach Säurebehandlung, anschließender Neutralisation, Dialyse gegen Wasser und Einstellung auf 50 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7,5. Diese Proben enthalten eine Mischung aus $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und deshalb einen Rest an spezifischer Akzeptorkapazität von 400 pMol/ $E_{260\text{nm}}$ -Einheit (34 % der ursprünglichen Akzeptorkapazität; vergleichbar mit dem quantitativen Verhältnis der beiden $E_{260\text{nm}}$ -Ver-

Forts. Leg. Abb. 11.

teilungen in Abb. 6a.). (—●—●—) Proben von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) nach Säurebehandlung von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$, Neutralisation, Äthanol-fällung und RPC-5-Chromatographie. Nur die $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP)-Fraktionen wurden vereinigt, gegen Wasser dialysiert und dann auf 50 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7,5 eingestellt. Jede Probe wurde bei der entsprechenden Temperatur 30 Minuten inkubiert, danach bei Raumtemperatur 60 Minuten stehengelassen und dann ebenfalls bei Raumtemperatur getestet. Die bezifferten Punkte gehören zu Proben, die analog behandelt wurden, jedoch vor dem Aminoacylierungstest auf 0 (1), 0,5 (2), 5 (3), 10 (4) und 20 (5) mM MgCl_2 eingestellt wurden. Die relativen Akzeptorkapazitäten beziehen sich auf eine ursprüngliche Akzeptorkapazität der hier verwendeten $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ von 1160 pMol/ $E_{260\text{nm}}$ -Einheit.

Renaturierung von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) eine Temperatur von 40 °C und eine Mg^{++} -Konzentration von mehr als 5 mM benötigt wird. Unter diesen Bedingungen können für $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) 75 - 90 % der Aminoacylierungskapazität von $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ erreicht werden.

3.6. Enzymkinetische Konstanten

Vergleichende enzymkinetische Untersuchungen können als empfindlichste Methode zum Nachweis geringer Strukturunterschiede zwischen zwei tRNS -Molekülen angesehen werden. So ist z.B. nach der durch UV-Bestrahlung induzierten Reaktion des 4-Thio-Uridinrestes von $\text{tRNS}_{\text{I}}^{\text{Val}}$ aus

E. coli mit dem Cytidinrest in Position 13 die Affinität dieser tRNS zur Valin:tRNS-Ligase(AMP) verringert (32). Eine ähnliche Änderung der Affinität zum Enzym wurde für die tRNS^{Tyr}_{Su+III} gefunden, in der im Anticodonarm ein Adenosin gegen ein Guanosin ausgetauscht ist (33). Und schließlich ist auch im Fall von tRNS^{Phe} aus Hefe nach Abspaltung der Y⁺-Base zwar die Michaelis-Menten-Konstante, K_m , für Phenylalanin:tRNS-Ligase(AMP) aus Hefe unverändert, doch die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion ist verringert (7). Die Ermittlung dieser beiden Parameter für eine allerdings nur wenig angereicherte Phenylalanin:tRNS-Ligase(AMP)-Präparation in Bezug auf tRNS^{Phe}_{ChEm} und tRNS^{Phe}_{ChEm}(AP) ergab folgende Werte: Für tRNS^{Phe}_{ChEm} ist $K_m = 0,11 \cdot 10^{-6}$ M und $V_{max} = 370 \text{ pMol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$. Die entsprechenden Werte für tRNS^{Phe}_{ChEm}(AP) zeigen eine Verminderung der Affinität zum Enzym mit einer Michaelis-Menten-Konstanten von $K_m = 0,25 \cdot 10^{-6}$ und eine Verminderung der Maximalgeschwindigkeit auf $V_{max} = 220 \text{ pMol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$.

4. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zur Charakterisierung von hochgereinigter phenylalaninspezifischer tRNS aus vorwiegend aus Muskulatur bestehendem Gewebe von 13 Tage alten Hühnerembryonen erbrachten den chromatographischen Nachweis von zwei Phenylalanin akzeptierenden Einzelspecies,

$\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ 1 und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ 2. Es wurde als nächstes die Existenz einer hochmodifizierten, hydrophoben und fluoreszierenden Base Y_{ChEm}^+ in der $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$, wie sie ähnlich auch in tRNS_{Phe} -Species aus anderen Organismen dem Anticodon 3'-benachbart gefunden wird, gezeigt. Y_{ChEm}^+ konnte aus $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ abgespalten, gereinigt und charakterisiert werden. Experimente mit $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP), dem tRNS-Produkt nach Abspaltung von Y_{ChEm}^+ , ließen auf eine ungewöhnliche Konformation schließen, zeigten, daß $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) nicht mehr mit Phenylalanin aminoacylierbar ist, und ermittelten Bedingungen zur Renaturierung und damit Wiedererlangung dieser biologischen Aktivität. Schließlich wurden enzymkinetische Parameter für $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) bestimmt.

Der chromatographische Nachweis der Existenz von isoakzeptierenden tRNS-Species ist nicht unumstritten. Während der verhältnismäßig aggressiven Methoden zur Extraktion von tRNS aus Geweben können Artefakte durch das Einwirken von Ribonucleasen, aber auch durch Reaktionen von chemisch labilen modifizierenden Gruppen an den sogenannten seltenen Basen in der tRNS entstehen. Beides kann Ursache des Auftretens von zwei oder mehr für eine Aminosäure spezifischen tRNS-Verteilungen bei säulenchromatographischen Experimenten sein. So hätte auch eine von beiden in der Muskulatur von 13 Tagen alten Hühnerembryonen nachgewiesenen $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ -Einzel-

species ein artefizielles Produkt, entstanden während der Präparation der Gesamt-tRNS, sein können. Dagegen spricht aber, daß das Profil der Aminoacylierung beider Species nach säulenchromatographischer Trennung in allen tRNS-Präparationen identisch war. Viel gewichtigere Argumente für die Existenz dieser beiden Species auch in vivo sind, daß sie sich zusammen rein darstellen lassen und dann nach Chromatographie nur unvollständig getrennt die gleiche spezifische Phenylalanin-Akzeptorkapazität besitzen. Die biologische Aktivität der einen, unvollständig abgetrennten Species beruht also nicht auf der Kontamination mit der aminoacylierbaren anderen. Selbst nach langer Inkubation bei pH 2,9 und erhöhter Temperatur zur Abspaltung von Y_{ChEm}^+ sind das Extinktionsprofil und die Aminoacylierungskapazität der beiden durch Säulenchromatographie von tRNS^{Phe}_{ChEm} (AP) abgetrennten tRNS^{Phe}_{ChEm}-Einzelspecies unverändert.

Trotz des Nachweises zweier tRNS^{Phe}_{ChEm}-Einzelspecies zeigt das tRNS-Produkt nach Abspaltung von Y_{ChEm}^+ , tRNS^{Phe}_{ChEm} (AP), keinen klaren Hinweis auf eine zweiphasige Verteilung, obwohl es bedeutend früher als tRNS^{Phe}_{ChEm} von der RPC-5-Säule eluiert wird und es bekannt ist, daß dieses Chromatographiersystem bei niedrigen Salzkonzentrationen bessere Trenneigenschaften hat. Das würde dafür sprechen, daß tRNS^{Phe}_{ChEm} (AP) nur aus einer der beiden tRNS^{Phe}_{ChEm}-Einzelspecies entsteht. Dafür spricht weiterhin, daß durch

Dünnschichtchromatographie nur eine Species Y_{ChEm}^+ isoliert werden konnte. Gegen die Abspaltung von Y_{ChEm}^+ aus nur einer $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ -Einzelspecies spricht, daß beide intakten $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ -Einzelspecies erst sehr spät sowohl von BD-Cellulose- als auch von RPC-5-Säulen eluiert werden und deshalb angenommen werden muß, daß beide Einzelspecies dieses hydrophobe, fluoreszierende Purin besitzen. Auch die Beobachtung, daß nach Y_{ChEm}^+ -Abspaltung die Menge beider Einzelspecies im gleichen Verhältnis abgenommen hat, spricht für die Existenz eines solchen Basentyps in beiden Species. Daß sich selbst im optimalen Trennbereich der RPC-5-Säulen zwei $tRNS_{ChEm}^{Phe}(AP)$ -Species nicht andeuten, scheint an der extrem entfalteten Konformation von $tRNS_{ChEm}^{Phe}(AP)$ zu liegen, einem Zustand, in dem sich beide $tRNS_{ChEm}^{Phe}(AP)$ -Species der RPC-5-Matrix gegenüber nur als Polyphosphate und nicht als Moleküle mit basensequenzabhängiger, hochspezifischer Tertiärstruktur verhalten. Die Frage, ob beide $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ -Species die gleiche Y_{ChEm}^+ -Base tragen oder ob zwei unterschiedlich modifizierte Purine existieren, die unter den angegebenen Abspaltungsbedingungen zu einer gemeinsamen Grundstruktur degradiert werden, kann nur durch weiterführende analytisch-chemische Untersuchungen geklärt werden.

Die vorliegenden Charakteristika von Y_{ChEm}^+ ergeben das Bild einer hochmodifizierten, hydrophoben, fluoreszie-

renden Base, die den anderen in der Literatur beschriebenen Y^+ -Basen in diesen Eigenschaften zwar ähnlich, in ihrem spezifischen Verhalten aber unterschiedlich ist. Fluoreszenzspektrophotometrische Untersuchungen zeigen, daß Y_{ChEm}^+ im tRNS-Molekül in einer bisher nur in $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ gefundenen sterischen Anordnungen vorliegt. Die isolierten Y^+ -Basen aus den anderen beschriebenen Organismen weisen in ihren Fluoreszenzspektren im Vergleich mit denen der ihnen zugehörigen $tRNS^{Phe}$ eine Verschiebung der Maxima zu längeren Wellenlängen auf. Diese Rotverschiebung ist gut mit der theoretischen Vorstellung vereinbar, daß die Abspaltung für die Y^+ -Base den Übergang von einer relativ hydrophoben Umgebung zwischen den planar, gestapelten, heterozyklischen Stickstoffbasen in das mehr polare Medium der wässrigen Lösung bedeutet (34,35). Im Unterschied dazu zeigen die Fluoreszenzspektren von isolierter Y_{ChEm}^+ im Vergleich zu denen von $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ eine Blauverschiebung, was nach der eben zitierten Interpretation bedeuten würde, daß Y_{ChEm}^+ aus dem hydrophoben Milieu des tRNS-Moleküls herausgedreht ist und sich in sehr polarer Umgebung befindet, so daß die wässrige Lösung für die abgespaltene Y_{ChEm}^+ -Base eine relativ weniger polare Umgebung darstellt.

$tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (AP), das andere Reaktionsprodukt der Säurebehandlung von $tRNS_{ChEm}^{Phe}$, ist im Gegensatz zu dem analogen Produkt von $tRNS^{Phe}$ aus Hefe,

tRNA^{Phe} (HCl) (7), nicht aminoacylierbar. Da es heute eine Reihe von Hinweisen dafür gibt, daß Veränderungen im Anticodonbereich des tRNA-Moleküls keinen Einfluß auf die Aminoacylierungskapazität haben, muß angenommen werden, daß die Abspaltung von Y_{ChEm}^+ Konformationsänderungen hervorruft, die weit über den Anticodonbereich hinausgehen (36). Derartige Konformationsänderungen müssen auch für tRNA^{Phe} (HCl) aus Hefe angenommen werden, denn die heterologe Aminosäure:tRNA-Ligase(AMP) aus *E. coli* aminoacyliert diese Molekülspecies nicht mehr, während sie native tRNA^{Phe} aus Hefe als Substrat akzeptiert. Wie tiefgreifend diese Konformationsänderungen im Fall von $\text{tRNA}^{\text{Phe}}_{\text{ChEm}}$ (AP) sind, verdeutlicht unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Polyacrylamidgel-Elektrophorese, die zeigen, daß es zu keinem Bruch der Polynucleotidkette gekommen ist, das langsame Sedimentationsverhalten dieses Moleküls. Die aus den Schmelzkurven ermittelten Daten geben mehr Auskunft über die Art dieser Konformation. Der nur noch vorhandene Rest von Hyperchromie und der niedrige Schmelzpunkt lassen darauf schließen, daß nur noch wenige Wasserstoffbrückenbindungen eine im wesentlichen entfaltete Struktur stabilisieren. Die im Verhältnis zu diesen Werten hohe Änderung der Standard-Enthalpie zeigt, daß diese Struktur nicht zufällig ist, sondern eine zum größten Teil nicht durch Wasserstoffbrücken-

bindungen vermittelte Ordnung darstellt. Dieser Zustand kann durch entsprechende Energiezufuhr aufgelöst werden und bei genügend hoher Mg^{++} -Konzentration kann eine aminoacylierbare, dreidimensionale Struktur stabilisiert werden. Daß auch diese Struktur mit der von $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ letztlich nicht identisch ist, zeigen die veränderten enzymkinetischen Parameter. Diese Interpretation der Daten läßt für die Entstehung von $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (AP) folgenden Ablauf vermuten: Durch die hohen Wasserstoffionenkonzentrationen, die zur Abspaltung von Y_{ChEm}^{+} notwendig sind, kommt es zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen und damit zur Entfaltung der Moleküle. Nach Beendigung der Abspaltungsreaktion durch Erhöhung des pH können diejenigen Moleküle, denen die Y^{+} -Base erhalten geblieben ist, ihre ursprüngliche dreidimensionale Struktur wieder einnehmen. Alle $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ (AP)-Moleküle aber "erstarren" in einer weitgehend entfalteten Konformation. Diese Modellvorstellung spricht dem Anticodon-loop eine Schlüsselstellung für die korrekte Rückfaltung des entfalteten $tRNS_{ChEm}^{Phe}$ -Moleküls zu (9), der er aber nur gerecht werden kann, wenn sich durch die Anwesenheit von Y_{ChEm}^{+} eine initial richtige Konformation einstellt. Derartige Nucleationsfunktionen, wie sie für bestimmte, sehr enge Molekülabschnitte in Proteinen beschrieben worden sind (37), müssen für tRNS so lange abgelehnt werden, wie Faltung

und Entfaltung unter der thermodynamischen Vorstellung eines "Alles-Oder-Nichts"-Prozesses betrachtet werden. Ein sequentieller Mechanismus für die Faltung des tRNA-Moleküls mit einer hierarchischen Ordnung für einzelne Molekülbereiche wird von einigen Autoren seit langem gefordert (38) und scheint sich aufgrund neuester Untersuchungen, die mit einer Kombination aus NMR-Spektrometrie und Temperatursprung-Methodik vorgenommen wurde (39), zu bestätigen. Ein derartiger Sequenzmechanismus könnte sich in einer Asymmetrie der Schmelzkurven, besonders in ihrer differenzierten Form, äußern und Abweichungen von der Linearität in den Van't Hoff-Darstellungen erkennen lassen. Abb. 8b und 9 lassen bei genauer Betrachtung unter Umständen solche Schlüsse zu, doch eine entsprechende Auswertung ist nicht zulässig, da alle Versuche mit einem Gemisch aus zwei Einzelspecies durchgeführt wurden, die mit ihren möglicherweise verschiedenen temperaturabhängigen Extinktionstransitionen eine derartige Asymmetrie hervorruufen können. Eine Berechnung der Enthalpieänderung nach der Methode von GRALLA und CROTHERS (40), die den Grad der Asymmetrie von Schmelzkurven in Differentialform berücksichtigen, ergab keine qualitativ unterschiedlichen Ergebnisse. Die Vorstellung einer Nucleationsfunktion des Anticodon-loops mit Y_{ChEm}^+ als notwendiger Voraussetzung läßt den Aufwand derart umfangreicher

Modifizierungen, wie sie in diesen Basen gefunden werden, sinnvoll erscheinen.

5. Zusammenfassung

In tRNS aus vorwiegend aus Muskulatur bestehendem Gewebe von 13 Tage alten Hühnerembryonen wurde die Existenz von zwei phenylalaninspezifischen tRNS-Einzelspecies, $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}} 1$ und $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}} 2$, nachgewiesen. Beide Species konnten zusammen als $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ hochgereinigt dargestellt werden. Wie phenylalaninspezifische tRNS aus dem Cytoplasma anderer eukaryoter Organismen fluoresziert auch $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ im ultravioletten Licht.

Durch milde Säurebehandlung ließ sich aus $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ eine hochmodifizierte, hydrophobe, fluoreszierende Base, f_{ChEm}^+ , abspalten, ohne die Polynucleotidkette des tRNS-Moleküls zu zerbrechen. Diese Base wurde gereinigt und durch ihre Ultraviolett-Extinktions- und Fluoreszenzspektren charakterisiert.

Das durch die Abspaltung der fluoreszierenden Base entstandene tRNS-Produkt, $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$, wurde isoliert und charakterisiert. $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}(\text{AP})$ läßt sich nicht mehr enzymatisch mit Phenylalanin aminoacylieren. Der Sedimentationskoeffizient beträgt nur noch 2,8 S, während die elektrophoretischen Eigenschaften unter denaturierenden Bedingungen im Vergleich mit $\text{tRNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ unverändert sind. Der Mittelwert der temperaturabhängigen Extinktionstransi-

tion (T_m) ist niedrig und der dabei gemessene hyperchrome Effekt gering. Dagegen ist die Enthalpieänderung ähnlich der von $\text{trNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$.

Durch individuelle "Renaturierungs"-Bedingungen kann die Phenylalanin-Akzeptorkapazität von $\text{trNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ (AP) wiederhergestellt werden. In diesem Zustand ist auch das Schmelzverhalten mit dem von nativer $\text{trNS}_{\text{ChEm}}^{\text{Phe}}$ vergleichbar. Veränderte enzymkinetische Parameter weisen aber auf eine veränderte dreidimensionale Struktur hin.

6. Literaturverzeichnis

1. U.L.RajBhandary, R.D.Faulkner und A. Stewart,
J. Biol.Chem., 243 (1968) 575.
2. D. Yoshikami, G. Katz, E.B. Keller und B.S. Dudock,
Biochim.Biophys. Acta, 116 (1968) 714.
3. L.M. Fink, T. Goto, F. Frankel und J.B. Weinstein,
Biochem.Biophys. Res. Commun., 32 (1968) 963.
4. T.P. Zimmerman, B. Robison und J.H. Gibbs,
Biochim.Biophys. Acta, 209 (1970) 151.
5. R. Thiebe, H.G. Zachau, L. Baczynskyi, K. Biemann
und J. Sonnenbichler,
Biochim. Biophys. Acta, 240 (1971) 163.
6. S.H. Kim, G.J. Quigley, F.L. Suddath, A. McPherson,
D. Sneden, J.J. Kim, J. Weinzierl und A. Rich,
Science (Wash.D.C.), 179 (1973) 285.
7. R. Thiebe und H.G. Zachau,
Eur. J. Biochem., 5 (1968) 546.
8. H. Gottschling,
unveröffentlichte Ergebnisse.
9. B. Wittig, S. Reuter und H. Gottschling,
Eur.J.Biochem., 49 (1974) 521.
10. F.J. Bollum,
J. Biol.Chem., 234 (1959) 2733.
11. B. Wittig, S. Reuter und H. Gottschling,
Biochim. Biophys. Acta, 331 (1973) 221.

12. I. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. von Tigerstrom,
E. Wimmer und G.M. Tener,
Biochemistry, 6 (1967) 3043.
13. R.C. Pearson, J.F. Weiss und A.D. Kelmers,
Biochim. Biophys. Acta, 228 (1971) 770.
14. B. Wittig,
Dissertation, 1976, Freie Universität Berlin.
15. G.A. Bray,
Anal. Biochem., 1 (1960) 279.
16. E.G. Richard, J.A. Coll und W.B. Gratzner,
Anal. Biochem., 12 (1963) 452.
17. G. Felsenfeld und G. Sandeen,
J. Mol. Biol., 5 (1962) 587.
18. J. Levy, G. Rialdi und R. Biltonen,
Biochemistry, 11 (1972) 4138.
19. W.-K. Yang und G.D. Novelli,
in "Methods in Enzymology", Vol.XX Part C (1971) S.44,
Academic Press New York and London.
20. R.C. Gallo und S. Pestka,
J.Mol.Biol., 52 (1970) 195.
21. S. Nishimura und I.B. Weinstrein,
Biochemistry, 8 (1969) 832.
22. L.M. Fink, K.W. Lanks, T. Goto und I.B. Weinstein,
Biochemistry, 10 (1971) 1873.

23. R. Shapiro,
in "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology", Vol. 8 (1968) S. 73, Academic Press New York and London.
24. R. Thiebe und K. Poralla,
FEBS letters, 38 (1973) 27.
25. S.A. Fairfield und W.E. Barnett,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 68 (1971) 2972.
26. T. Svedberg und K.O. Pedersen,
in "The Ultracentrifuge", Oxford University Press, London and New York, 1940.
27. W. Wintermeyer und H.G. Zachau,
Biochim. Biophys. Acta, 299 (1973) 82.
28. J. Schmidt und B.R. Reid,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 5 (1970) 1261.
29. P. Philippsen, R. Thiebe, W. Wintermeyer und H.G. Zachau,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 33 (1968) 922.
30. R.H. Reeves, C.R. Cantor und R.W. Chambers,
Biochemistry, 9 (1970) 3993.
31. J.R. Fresco, A. Adams, R. Ascione, D. Henley und T. Lindahl,
Cold Spring Harbor Quant. Biol., XXXI (1966) 527.
32. A. Favre, M. Yaniv und A.M. Michelson,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 37 (1969) 266.

33. J.N. Abelson, M.L. Jeffer, L. Barnett, A. Landy,
R.L. Russell und J.D. Smith,
J.Mol.Biol., 47 (1970) 15.
34. J. Eisinger, B. Feuer und T. Yamane,
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 65 (1970) 638.
35. K. Beardsley, T. Tao und C.R. Cantor,
Biochemistry, 9 (1970) 3524.
36. H.G. Zachau,
Angew.Chem., 81 (1969) 645.
37. C.B. Anfinsen, P. Cuatrecasas und H. Taniuchi,
in "The Enzymes", Vol. IV (1971) S. 177, Academic
Press, New York.
38. R. Römer, D. Riesner, S.M. Coutts und G. Maass,
Eur. J.Biochem., 15 (1970) 77.
39. D.M. Crothers, P.E. Cole, C.W. Hilbers und
R.B. Shulman,
J.Mol.Biol., 87 (1974) 63.
40. J. Gralla und D.M. Crothers,
J.Mol.Biol., 78 (1973) 301 .

In dieser Arbeit wurden einige Abbildungen der Publikation: B. Wittig, S. Reuter und H. Gottschling, Eur. J. Biochem., 49 (1974) 521, mit der Erlaubnis des Verlages reproduziert.

